

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

JC997 U.S. PTO

09/923130



08/06/01

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，

其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2000 年 10 月 06 日
Application Date

申請案號：089120904
Application No.

申請人：財團法人工業技術研究院
Applicant(s)

局長

Director General

陳明邦

發文日期：西元 2000 年 12 月 16 日
Issue Date

發文字號：08911017735
Serial No.

申請日期	89.10.06
案 號	89120904
類 別	發明

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	可供細胞貼附或固定的載體及其製備方法
	英 文	" CARRIER FOR CELL ATTACHMENT OR FIXATION AND ITS PROCESS FOR PREPARATION"
二、發明 人	姓 名	1. 陳俊傑 2. 劉有台 3. 張景明 4. 胡振宇
	國 籍	1. ~ 4. 皆中華民國
	住、居所	1. 台南市金華路三段32號 2. 新竹市光復路二段18巷9號 3. 新竹市光復路一段531巷72-7號6樓 4. 台北縣中和市錦新街418巷3號7樓
三、申請人	姓 名 (名稱)	財團法人工業技術研究院
	國 籍	中華民國
	住、居所 (事務所)	新竹縣竹東鎮中興路四段195號
	代 表 人 姓 名	林信義

四、中文發明摘要(發明之名稱： 可供細胞貼附或固定的載體及其製備方法)

本發明揭示一種可提供細胞貼附或固定的載體及其製備方法，其可供細胞培養之用。

該載體為利用聚合物經熔融後經由噴嘴紡成纖維，再以空氣或機械方式延伸直接於成型網上形成三度空間樹枝狀網狀交連不織布結構體，並經過表面活化接枝處理形成細胞親和性基材，以促進細胞的附著與生長。為保持載體的挺度與避免載體與載體間的過度密合，載體表面為皺摺形狀、或凹凸山丘形狀。

英文發明摘要(發明之名稱： " CARRIER FOR CELL ATTACHMENT OR
FIXATION AND ITS PROCESS FOR
PREPARATION ")

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

本案在向中華民國提出申請前未曾向其他國家提出申請

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明之背景

1. 發明之領域

本發明係關於一種載體及其製法，更具體而言，係關於一種可供細胞貼附或固定的載體，可提供細胞培養之用。

2. 先前技藝之說明

動物細胞培養工業隨著生物科技的進步而日趨重要，其市場價值有增無減。由於動物細胞具有生長速度慢、易受剪力傷害、培養易遭受微生物污染、培養成本及風險高、加上大部分動物細胞具有貼壁依賴性（anchorage-dependent）等特性，除了少部分製程利用懸浮性細胞懸浮培養，一般皆將細胞固定於載體上，例如微載體、多孔陶瓷載體、纖維載體或中空纖維載體等。

一般習見之細胞貼附載體約可分成兩類：一類為表面光滑之微粒載體，僅提供表面給細胞貼附生長，另一類為多孔性載體，細胞可以深入載體內部。第一類載體除了可以提供細胞生長外，細胞亦容易脫附，方便細胞的回收，但因為表面光滑，因此表面積無法提昇；第二類載體雖然可以提供較大的細胞貼附面積，但由於細胞深入載體內部，不容易回收細胞。

美國專利第5,266,476號揭示一供細胞培養的纖維材質載體，此載體為雙層片狀，由經過裁切

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

之不織布纖維以及一層聚合物格網所組成。此載體提供相當大的表面積／體積比，因此可以有有效的增加細胞密度；而且由於其為薄片狀結構，養分可以充分供應，纖維內部的細胞不會因為缺乏氧氣或養料而死亡。然而，其缺點在於，為了提高載體硬度，不織布纖維結合硬度較高之聚合物格網，以形成雙層結構之載體，不僅增加加工複雜性而大幅增加成本，並且降低載體的面積／體積比；再者，該聚合物格網的纖維係以一般紡絲加工方式生產，會有殘留紡織油劑需要後處理之問題。

針對習知載體的缺點，有必要提出一種新穎有效的載體以供業界使用。本發明提供一種單層供細胞貼附或固定的載體，不僅簡化載體的加工複雜性，且具有樹枝狀的連續結構，以促進細胞生長。

發明之概述

本發明揭示一種提供細胞貼附及固定的載體，除了提供細胞的貼附延展外，更有保護細胞免於遭受機械的傷害，維持細胞安定性等功能。

為達成上述目地及避免習知技術的缺點，本發明之一目的在於提供一種供細胞貼附及固定的載體，其係利用將聚合物經熔融後由噴嘴紡成纖維，再以空氣或機械方式延伸成細纖維，並直接

五、發明說明（3）

於成型網上成形等加工方式處理而形成不織布結構體，所形成的不織布結構體的纖維之間彼此相連形成如樹枝狀的三度空間網狀交連結構。而且，該纖維結構具有細胞貼附性及生長的環境。

本發明之另一目的在於提供單層不織布之載體，其簡化製備載體之複雜性，且加工過程中不需使用任何的紡絲油劑或其他添加劑，不會造成二次污染問題。

本發明之再一目的在於提供一不織布載體，其不織布表面形成皺摺形狀或是凹凸山丘形狀以提高載體挺度，當載體充填於充填床時，可以有效保持載體與載體間的空隙。

本發明之又一目的在於提供一種不織布載體之製備方法，其係利用聚合物經熔融後由噴嘴或紡嘴形成纖維，再將該纖維延伸，並直接於成型網上形成不織布結構體，並再經表面活化接枝處理，而使不織布纖維表面具有細胞親和性。

圖式簡單說明

圖1表示本發明之纖維不織布載體之SEM圖，其載體為凹凸單層片狀20倍放大圖；

圖2表示本發明之纖維不織布載體之SEM圖，其載體為樹枝狀結構纖維150倍放大圖；

圖3表示市售產品與本發明PP網狀載體之細胞

五、發明說明(4)

培養效果之比較圖；

圖4(A)表示基重 50g/m^2 載體之生長結果圖；

圖4(B)表示基重 30g/m^2 載體之生長結果圖；

圖5表示以市售之PET不織布製造之載體比較有無以血清培養之細胞生長情形；

圖6表示以市售PP超細纖維不織布製造之載體比較有無以血清培養之細胞生長情形；以及

圖7表示以本發明自行製造之PP 3-D網路不織布載體比較有無以血清培養之細胞生長情形。

發明之詳細說明

為避免習知技術的缺點，本發明揭示一種由聚合物熔噴法所形成的不織布結構體，其係利用將聚合物經熔融後由噴嘴或紡嘴定量吐出，再延伸成為纖維細度約2微米至約15微米之不織布纖維，並利用成型網以形成不織布結構體。其中，延伸可藉由空氣或機械方式達成，單根不織布纖維形狀為圓形或不規則狀之實心或中空纖維管，不織布結構體的孔隙度從40%至90%。

其中，該聚合物材料係選自下列群組：聚乙烯(polyethylene)、聚丙烯(polypropylene)、聚胺基甲酸乙酯(polyurethane)、聚酯(polyester)、聚丙烯腈(polyacrylonitrile)、聚醋酸乙烯酯摻合物(polyvinyl acetate compounding)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)、

五、發明說明 (5)

聚乳酸 (polylactic acid) 、 聚偏二氯乙烯 (polyvinylidene chloride) 、 聚苯乙烯 (polystyrene) 、 聚丁二烯 (polybutadiene) 、 玻璃纖維 (glass fiber) 、 纖維素 (cellulose) 、 氟碳樹脂 (fluorocarbon resin) 、 膠原蛋白 (collagen) 以及其共聚物 (copolymer) 。

所形成的不織布結構體在纖維之間彼此相連形成如樹枝狀的連續結構，且該纖維經過活化接枝 (activated grafting) 表面處理，使該不織布結構體薄片形成具細胞親和性的載體，以促進細胞的附著與生長。

本發明之載體厚度約為200微米至600微米，再經過裁切或打孔機形成一薄片狀載體，其中該載體的形狀為圓形、方形、多角形或不規則狀。所形成的不織布結構為單層片狀，且其表面為皺摺形狀或凹凸山丘形狀，藉此提高載體的挺度，有效保持載體與載體間的空隙，提供充分的氧氣與養分至細胞內，並避免須利用載體與聚合物格網黏合以提高載體挺度的加工複雜性，及避免加工過程中需使用的紡絲油劑或其他添加劑，不會造成二次污染問題。

相較於習知技術，本發明之載體由聚合物直接成形纖維組成之高孔隙度的不織布結構體，經過特殊表面親和性處理而成，可以提供相當大的

五、發明說明(6)

表面積／體積比，並可控制孔隙分佈及纖維細度，且形成樹枝狀的連續結構，更便利細胞的附著與爬行，可以促進細胞的增生速度。另外，載體表面為皺摺或凹凸狀，使每一片載體的兩面皆可以接觸到培養基，以提供細胞充足的養分及空氣，進而得到的細胞培養結果比目前市售載體效果更好，並且有更多製程上的優點。

本發明亦提供一種可供細胞貼附或固定的載體的製備方法，其步驟包含：

將聚合物經熔融後由噴嘴或紡嘴形成連續纖維狀；

以空氣或以機械方式將纖維延伸，並在成型網上形成不織布結構體；

經活化接枝表面處理不織布結構體表面，以具有細胞親和性。

本發明所揭示之方法更進一步於活化接之前將該不織布結構體經由熱壓，使其表面形成凹凸山丘形狀。

另外，該活化接枝表面處理係以電漿(plasma)活化法、電暈(corona)活化法、紫外線活化法、輻射(radiation)活化法、或溼式化學活化法以活化該不織布纖維的表面，以增加細胞親合性。

待該不織布結構體的表面經活化表面處理

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(7)

後，使其暴露於同時具有不飽和官能基與極性官能基之單體的電漿下以進行接枝的步驟。其中，不飽和鍵官能基係選自：雙鍵或單鍵；而具有不飽和官能基的化合物係選自：炔類或烯類。極性官能基係選自：胺基(-NH₂)、羧基(-COOH)、羥基(-OH)以及磺酸鹽(SO₃Na)；而具有極性官能基的化合物係選自：胺類、羧酸類、醇類、磺酸鹽類以及其衍生物。以胺類為例，當胺類單體經由不飽和鍵斷鍵，並快速與已活化的基材表面反應而產生鍵結，其中，胺基並不會受到破壞，且經由表面活化接枝而得的胺基，可以在常溫常壓下保存至少一年以上。

本發明之技術內容及技術特點已揭示如上，然而熟悉本項技術之人士仍可能基於本發明之教示及揭示而作種種不背離本發明精神之替換及修飾；因此，本發明之保護範圍應不限於實施例所揭示者，而應包括各種不背離本發明之替換及修飾，並為以下之申請專利範圍所涵蓋。

實施例1

將 MFR 700 聚丙烯顆粒放入擠壓機熔融後，經由 280 °C 噴頭，紡嘴直徑為 0.5 mm 及 290 °C 熱空氣下形成纖維，並將該纖維延伸成纖維細度 10 微米，再利用成型輸送網形成三度空間交錯

五、發明說明 (8)

之不織布結構體，基重為 50 g/m^2 。將上述不織布結構體經過熱花輪壓紋，使其表面形成凹凸山丘形狀，再使用沖模機，將上述不織布結構體沖壓成直徑 6 mm 的圓形不織布結構體。將此不織布結構體以甲醇蒸洗八小時，在室溫下陰乾，於電漿機內先以氬/氧比例為 10 比 1，流量為 500 ml/min ，且其能量為 200 瓦及壓力為 50 mtorr 的條件下進行表面活化處理 2 分鐘，接著並進行如下表所列各組的表面接枝處理實驗。

表面接枝之壓力： 40 mtorr

	能量 (W)	丙烯胺 (%)	時間 (min)
A	15	30	5
B	15	30	2
C	15	30	5
D	15	30	8
E	20	30	5
F	15	37	5
G	15	30	5
H	10	30	5

處理後之載體以 99.5% 乙醇浸泡隔夜滅菌，準備一個 96 孔盤，將各待測載體一片置入一個孔槽內。控制組為市售產品 Fibracel。各種條件重複三次。另外準備非洲綠猴腎臟細胞 (VERO, ATCC)，每個孔槽內置放約 10000 個

五、發明說明 (9)

細胞，每個孔槽添加 200 ul M199/5% 小牛血清培養基。在 37°C 下，5% CO₂ 的環境下培養四天。

將培養後載體上培養基吸走，配製 MTT 溶液 (4 mg MTT/10 ml PBS)，每個孔槽內加入 100 ul MTT 溶液，置入二氧化碳培養箱培養 3 小時。將 MTT 溶液吸走，加入 100 ul 二甲亞砜 (DMSO)，置放 20 分鐘。將反應後的溶液每孔取 50 ul 至另一個 96 孔盤。以 ELISA Reader 在波長 560 nm 下測吸收值。

實驗結果如圖三所示：該結果顯示本發明之 PP 網狀載體可以比市售產品有更佳的細胞培養效果。

實施例 2

將 MFR 700 聚丙烯顆粒放入擠壓機熔融後，經由 280°C 噴頭，紡嘴直徑為 0.5 mm 及 290°C 熱空氣下形成纖維，再將該纖維延伸成纖維細度 10 微米，並利用成型輸送網形成三度空間網路交錯之不織布結構體，基重各為 50 g/m² (PP-thick) 及 30 g/m² (PP-thin)。將上述不織布結構體經過熱花輪壓紋，表面形成凹凸山丘形狀。再使用沖模機，將上述不織布結構體沖壓成直徑 6 mm 的圓形不織布結構體。將此不織布結構體以甲醇蒸洗八小時，在室溫下陰乾，在電漿機內先以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

氫/氧比例為 10 比 1，流量為 500 ml/min，且其能量為 200 瓦及壓力為 50 mtorr 的條件下進行表面接枝活化，接著並進行如下表所列各組的表面接枝處理實驗。

	A	B	C	D	E
能量(瓦)	15 W*	15 W	15 W	15 W	15 W
流速 ml/min	500	500	500	500	500
丙烯胺	5%	10%	30%	10%	10%
時間 min	5	5	5	5	5
壓力 mtorr	40	40	40	80	120

處理後之載體以 99.5% 乙醇浸泡隔夜滅菌，準備一個 96 孔盤，將各待測載體一片置入一個孔槽內。控制組為市售產品 Fibra-Cel。各種條件重複六次。另外準備非洲綠猴腎臟細胞 (VERO, ATCC)，每個孔槽內置放約 10000 個細胞，每個孔槽添加 200ul M199/5% 小牛血清培養基。在 37°C 下，5% CO₂ 的環境下培養四天。

將培養後的載體上培養基吸走，配製 MTT 溶液 (4 mg MTT/10 ml PBS)，每個孔槽內加入 100ul MTT 溶液，置入二氧化碳培養箱培養 3 小時。將 MTT 溶液吸走，加入 100ul 二甲亞砜 (DMSO)，置放 20 分鐘。將反應後的溶液每孔取 50ul 至另一個 96 孔盤。以 ELISA Reader 在波長 560 nm 下測吸收值。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

實驗結果如圖 4A 及 4B 所示，即其結果顯示基重 50 g/m^2 比基重 30 g/m^2 之載體有較佳的細胞生長效果，但兩者皆比市售產品佳。

實施例 3

將 MFR 700 聚丙烯 (PP) 顆粒放入擠壓機熔融後，經由 280°C 噴頭，紡嘴直徑為 0.5 mm 及 290°C 熱空氣下形成纖維，再將纖維延伸成纖維細度 10 微米，並利用成型輸送網形成三度空間交錯之不織布結構體，基重為 50 g/m^2 。將上述不織布結構體經過熱花輪壓紋，表面形成凹凸山丘形狀。再使用沖模機，將上述不織布結構體沖壓成直徑 6 mm 的圓形不織布結構體。另外將商品化之 PET 不織布結構體及 PP 超細纖維不織布結構體，利用沖模機，將上述不織布沖壓成直徑 6 mm 的圓形不織布結構體。將此不織布結構體以甲醇蒸洗八小時，在室溫下陰乾，在電漿機內先以氫/氧比例為 10 比 1，流量為 500 ml/min ，且其能量為 200 瓦及壓力為 50 mtorr 的條件下進行表面活化 5 分鐘，接著並進行如下表所列各組的表面接枝處理實驗。

表面接枝之壓力： 60 mtorr

	能量 (W)	丙烯酸酯 (%)	丙烯胺 (%)	時間 (min)

五、發明說明 (12)

1	20	15	35	2
2	30	20	35	2
3	30	20	35	6
4	30	10	35	6
5	30	10	35	2
6	10	10	35	2
7	10	10	35	6
8	10	20	35	6
9	10	20	35	2
6'	10	10	35	2
7'	10	10	35	6
8'	10	20	35	6
9'	10	20	35	2

處理後之載體以 99.5% 乙醇浸泡隔夜滅菌，準備一個 96 孔盤，將各待測載體一片置入一個孔槽內。控制組為市售產品 Fibra-Cel。各種條件重複六次。另外準備非洲綠猴腎臟細胞 (VERO, ATCC)，每個孔槽內置放約 10,000 個細胞，每個孔槽添加 200ul M199/5% 小牛血清培養基，或無血清培養基 SRCH6000。在 37℃ 下，5% CO₂ 的環境下培養四天。

將培養後的載體上培養基吸走，配製 MTT 溶液 (4 mg MTT/10 ml PBS)，每個孔槽內加入 100ul MTT 溶液，置入二氧化碳培養箱培養 3.5 小時。將 MTT 溶液吸走，加入 100ul 二甲亞砜 (DMSO)，置放 20 分鐘。將反應後的溶液每孔

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

取 50ul 至另一個 96 孔盤。以 ELISA Reader 在波長 560 nm 下測吸收值。

本實施例與市售 PET 或 PP 不織布實驗結果如圖 5、圖 6 以及圖 7 所示，即該結果顯示市售 PET 不織布及熔噴 PP 不織布所製造的載體皆有不錯的細胞生長結果。但在無血清的培養條件下，本發明之熔噴 PP 不織布纖維所製造的樹枝狀的連續結構載體有明顯的促進細胞生長效果。

本發明的特徵及方法，經上述實例說明將更為明顯，現應瞭解的是，任何不脫離本發明精神下所為之修飾或改變，皆屬本發明意圖保護者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種可供細胞貼附或固定的載體，其係利用聚合物熔融後經噴嘴所形成之纖維，再經延伸後，直接成型為不織布結構體而得，其中該不織布纖維彼此之間相連形成如樹枝狀的三度空間網狀交連結構，且不織布纖維表面具有細胞親和性。
2. 如申請專利範圍第1項之載體，其為單層片狀。
3. 如申請專利範圍第1項之載體，其中該不織布纖維的細度介於2至15微米之間。
4. 如申請專利範圍第1項之載體，其中該樹枝狀的三度空間網狀交連之結構組成一不織布結構體。
5. 如申請專利範圍第1項之載體，其中該不織布結構體的孔隙度介於40%至90%之間。
6. 如申請專利範圍第1項之載體，其表面為皺摺狀或凹凸山丘狀。
7. 如申請專利範圍第1項之載體，其中不織布纖維係由聚合物熔噴成型所製得。

六、申請專利範圍

8. 如申請專利範圍第1項之載體，其形狀經切割為圓形、方形、多角形或不規規形狀之立體結構。
9. 如申請專利範圍第1項之載體，其厚度介於200微米至600微米之間。
10. 如申請專利範圍第1項之載體，其形狀為圓形且直徑介於2mm至10mm之間。
11. 如申請專利範圍第1項之載體，其中該聚合物的材料係選自下列群組：聚乙烯（polyethylene）、聚丙烯（polypropylene）、聚胺基甲酸乙酯（polyurethane）、聚酯（polyester）、聚丙烯腈（polyacrylonitrile）、聚醋酸乙烯酯摻合物（polyvinyl acetate compounding）、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol）、聚乳酸（polylactic acid）、聚偏二氯乙烯（polyvinylidene chloride）、聚苯乙烯（polystyrene）、聚丁二烯（polybutadiene）、玻璃纖維（glass fiber）、纖維素（cellulose）、氟碳樹脂（fluorocarbon resin）、膠原蛋白（collagen）以及其共聚物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

六、申請專利範圍

(copolymer)。

12. 如申請專利範圍第1項之載體，其中該不織布纖維的表面係經過活化接枝(activated grafting)表面處理以具有細胞親和性。
13. 如申請專利範圍第12項之載體，其中該活化接枝表面處理係以電漿(plasma)活化法、電暈(corona)活化法、紫外線活化法、輻射(radiation)活化法、或溼式化學活化法以活化該等纖維的表面。
14. 如申請專利範圍第12項之載體，其中該活化接枝表面處理，係將載體表面暴露在同時具有不飽和官能基與具有極性官能基單體的條件下。
15. 如申請專利範圍第14項之方法，其中該不飽和鍵係選自下列群組：雙鍵以及參鍵。
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中具有該不飽和鍵之化合物係選自下列群組：炔類以及烯類
17. 如申請專利範圍第14項之方法，其中該極性官

六、申請專利範圍

能基係選自下列群組：胺基、羧基、羥基以及磺酸鹽類。

18. 如申請專利範圍第17項之方法，其中具有該極性官能基之化合物係選自下列群組：胺類、羧酸類、醇類、磺酸鹽類及其衍生物。

19. 一種可供細胞貼附或固定的載體的製備方法，包括下列步驟：

將聚合物經熔融後由噴嘴或紡嘴形成纖維；

將纖維延伸，並利用成型網形成不織布結構體；以及

經表面處理，使不織布結構體表面具有細胞親和性。

20. 如申請專利範圍第19項之製備方法，在表面處理前進一步包括下述步驟：

將該不織布結構體形成皺摺狀或凹凸山丘狀。

21. 如申請專利範圍第20項之製備方法，其中係利用熱壓將不織布結構體形成皺摺狀或凹凸山丘狀。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

六、申請專利範圍

22. 如申請專利範圍第19項之方法，其中將不織布纖維延伸之方法係以空氣或機械方式達成。
23. 如申請專利範圍第19項之方法，其中該表面處理係以表面活化接枝處理。
24. 如申請專利範圍第23項之方法，其中該活化接枝表面處理係以電漿 (plasma) 活化法、電暈 (corona) 活化法、紫外線活化法、輻射 (radiation) 活化法、或溼式化學活化法以活化該等纖維的表面。

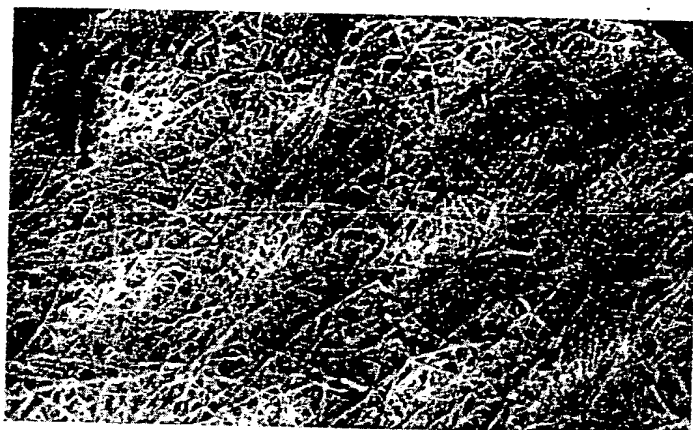


圖 1



圖 2

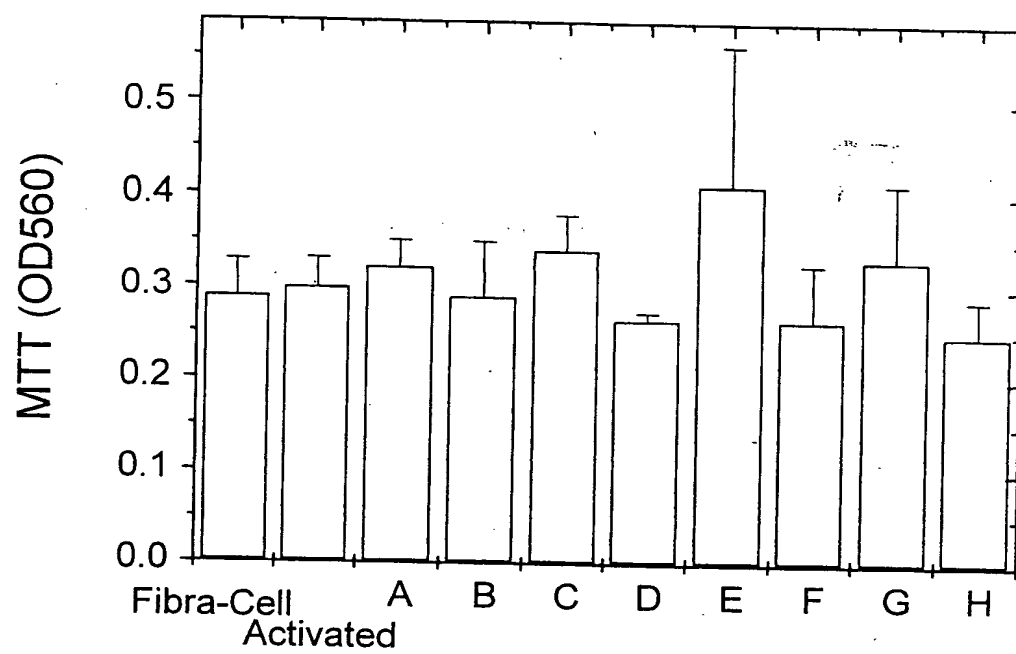


圖3

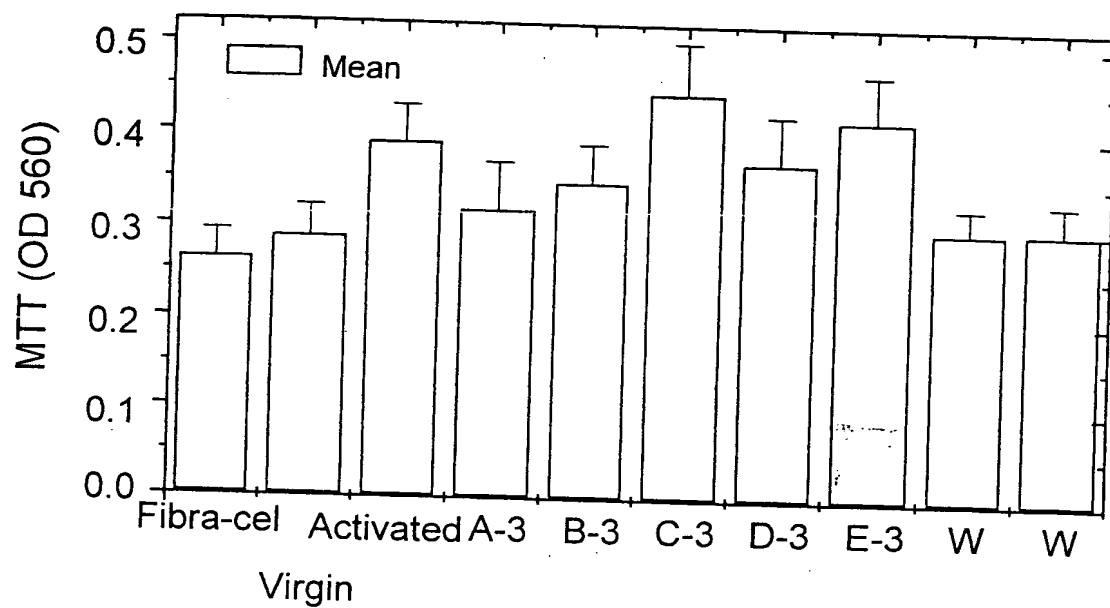


圖 4(A)

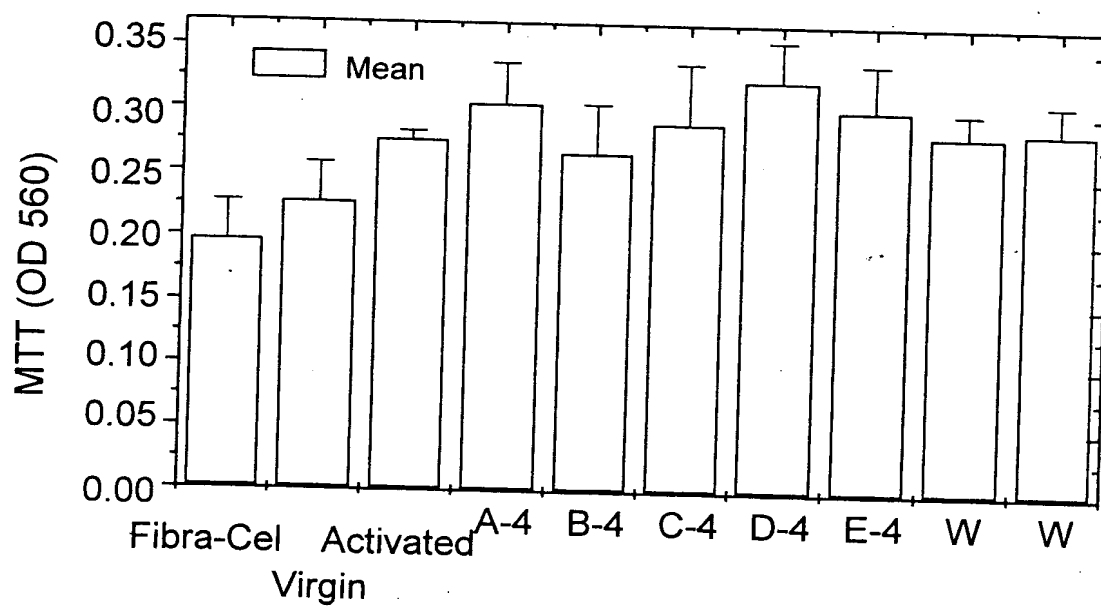
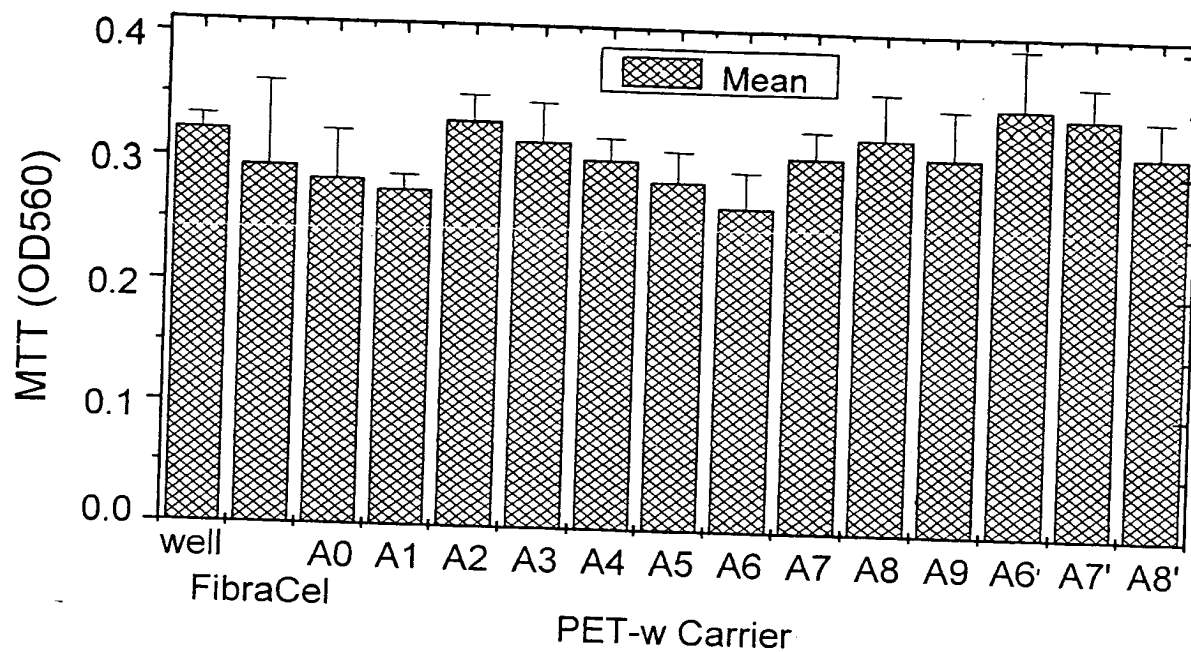


圖 4(B)

含血清培養(培養基:M199/5%FBS)



無血清培養(培養基:SFCH6000)

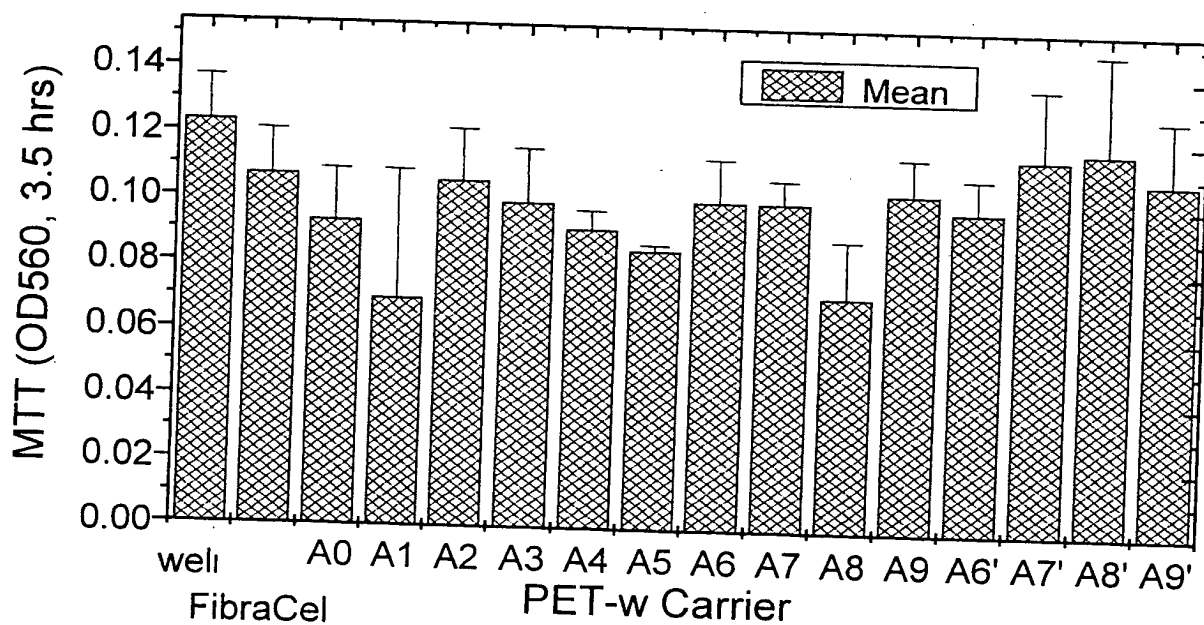
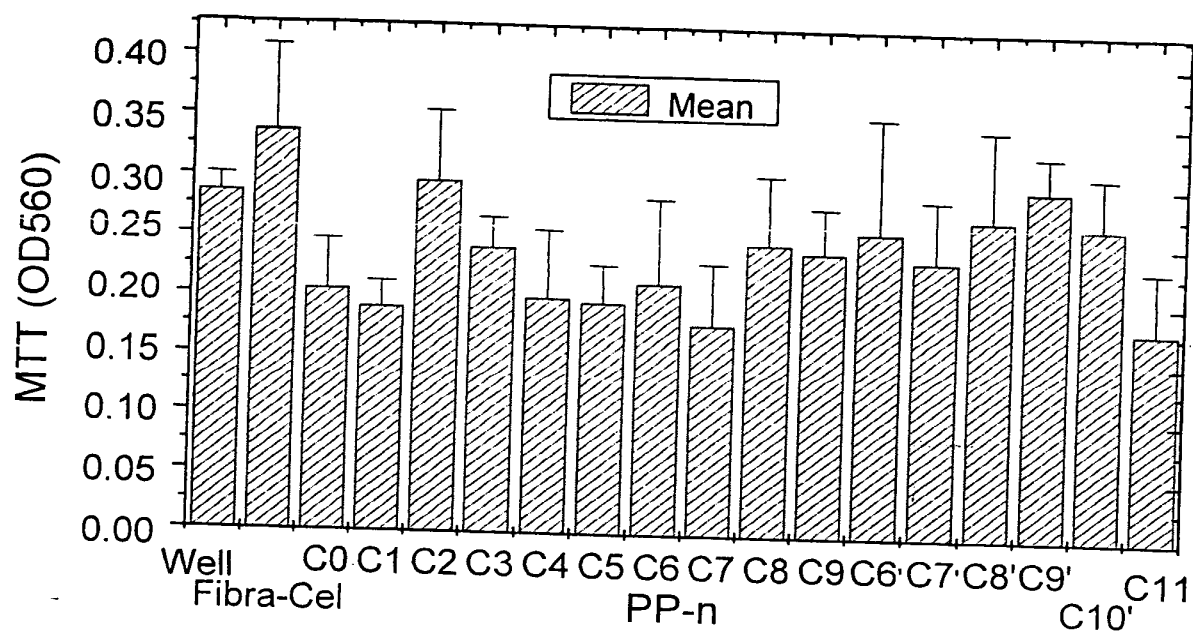


圖 5

含血清培養基(培養基:M199/5%FBS)



無血清培養基(培養基:SFCH6000)

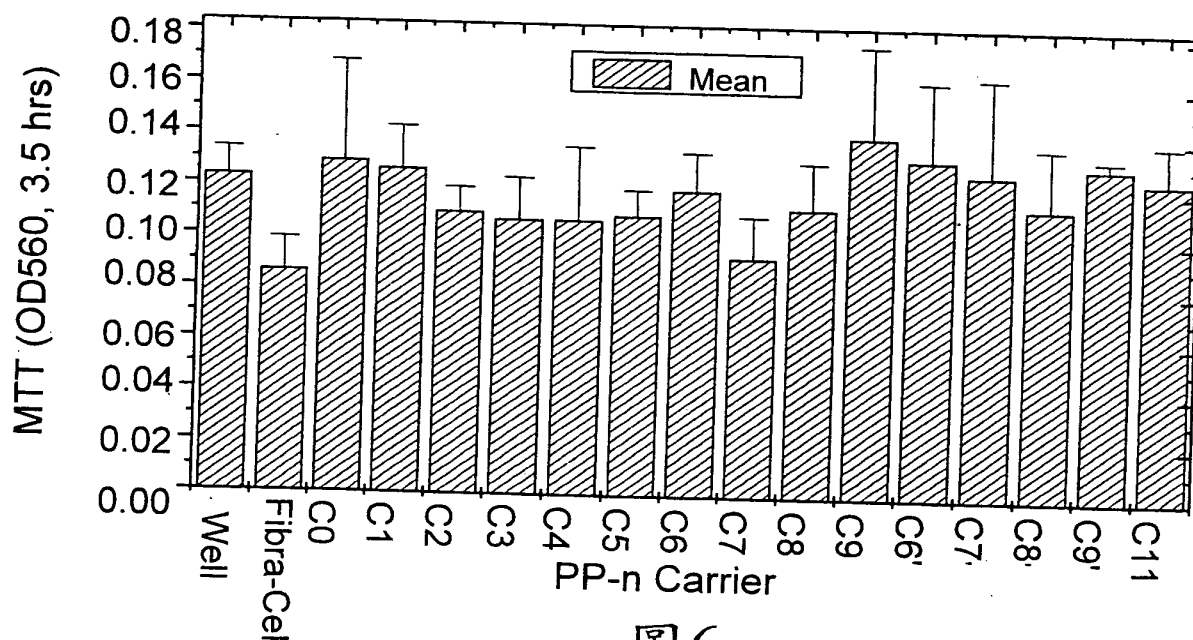
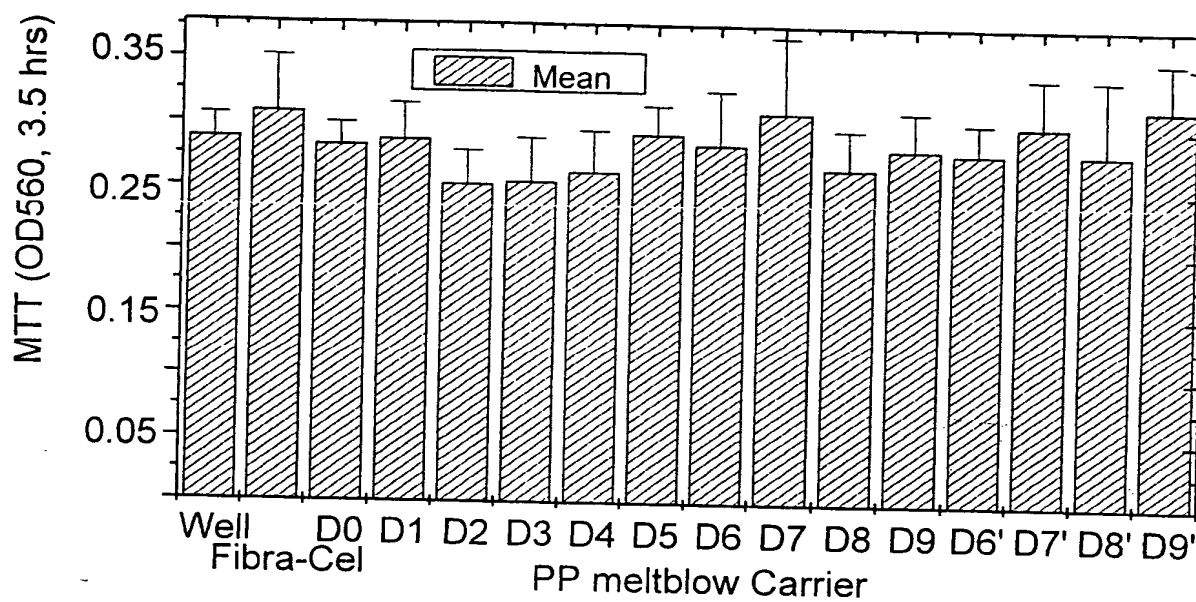


圖6

含血清培養(培養基:M199/5%FBS)



含血清培養(培養基:M199/5%FBS)

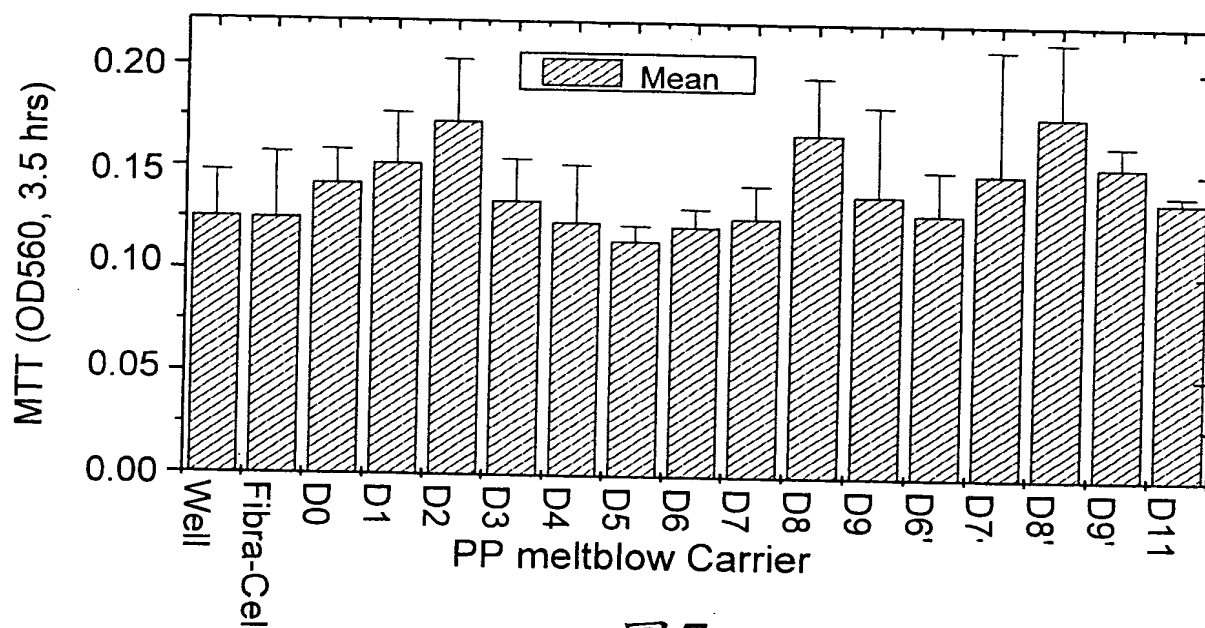


圖 7